

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-329551

(43)Date of publication of application : 29.11.1994

(51)Int.CI.

A61K 37/64

C12N 15/11

(21)Application number : 05-191246

(71)Applicant : MITSUBISHI KASEI CORP

(22)Date of filing : 02.08.1993

(72)Inventor : TAKASHIMA AKIHICO

HOSHINO TOSHIIMITSU

IMAHORI KAZUTOMO

SAITO KENICHI

(30)Priority

Priority number : 05 85143 Priority date : 22.03.1993 Priority country : JP

(54) PREVENTING OR THERAPEUTIC AGENT FOR ALZHEIMER DISEASE AND METHOD
FOR SCREENING THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a preventing or a therapeutic agent for Alzheimer disease utilizing tau protein kinase I (TPKI) and a method for screening the preventing or therapeutic agent utilizing amyloid β protein.

CONSTITUTION: The preventing or therapeutic agent for Alzheimer disease contains a substance having inhibiting action on TPKI or an anti-sense oligonucleotide capable of hybridizing with DNA or mRNA of the TPKI as an active ingredient. The substance having the inhibiting action on the TPKI has action on the inhibition of cell death of a neuron in incubating the substance with the neuron and amyloid β protein. The preventing or therapeutic agent is capable of suppressing the phosphorylating activity of the TPKI with the amyloid β protein and inhibiting the cell death of a cerebral neuron. Thereby, the effectiveness of a medicine presumed to be effectively usable as the preventing or therapeutic agent for Alzheimer disease is judged by incubating the medicine with the neuron and amyloid β protein based on whether the cell death of the neuron is inhibited or not.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 27.07.2000

[Date of sending the examiner's decision of
rejection][Kind of final disposal of application other
than the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection][Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2000 Japan Patent Office

(1)

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-329551

(43)公開日 平成6年(1994)11月29日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 37/64	AAM	8314-4C		
C 12 N 15/11		9050-4B	C 12 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全7頁)

(21)出願番号	特願平5-191246	(71)出願人	000005968 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成5年(1993)8月2日	(72)発明者	高島 明彦 東京都町田市南大谷字11号916番地の2 株式会社三菱化成生命科学研究所内
(31)優先権主張番号	特願平5-85143	(72)発明者	星野 嵩三 東京都町田市南大谷字11号916番地の2 株式会社三菱化成生命科学研究所内
(32)優先日	平5(1993)3月22日	(72)発明者	今堀 和友 東京都町田市南大谷字11号916番地の2 株式会社三菱化成生命科学研究所内
(33)優先権主張国	日本 (JP)	(74)代理人	弁理士 長谷川 曜司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルツハイマー病の予防または治療薬およびそのスクリーニング方法

(57)【要約】

【構成】 タウプロテインキナーゼ Iに対し阻害作用を有する物質を有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療薬、タウプロテインキナーゼ IのDNAまたはmRNAとハイブリダイズ可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療薬、並びに、アルツハイマー病の予防または治療薬として有効であると推定される薬剤、神経細胞およびアミロイド β プロテインをインキュベートし、該神経細胞の細胞死が阻止されれば該薬剤がアルツハイマー病の予防または治療薬として有効であると判定する、アルツハイマー病の予防または治療薬のスクリーニング方法。

【効果】 本発明のアルツハイマー病の予防および治療薬によればアミロイド β プロテインによるタウプロテインキナーゼ Iのリン酸化活性を抑制することにより、脳神経細胞死を阻止することができる。さらにその機構を利用してアルツハイマー病の予防又は治療薬のスクリーニングを行うことが可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 タウプロテインキナーゼIに対し阻害作用を有する物質を有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療薬。

【請求項2】 タウプロテインキナーゼIに対し阻害作用を有する物質が、該物質を神経細胞およびアミロイド β プロテインとともにインキュベートした際に、該神経細胞の細胞死を阻止する作用を有することを特徴とする請求項1記載のアルツハイマー病の予防または治療薬。

【請求項3】 タウプロテインキナーゼIのDNAまたはmRNAとハイブリダイズ可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療薬。

【請求項4】 アルツハイマー病の予防または治療薬として有効であると推定される薬剤、神経細胞およびアミロイド β プロテインをインキュベートし、該神経細胞の細胞死が阻止されれば該薬剤がアルツハイマー病の予防または治療薬として有効であると判定する、アルツハイマー病の予防または治療薬のスクリーニング方法。

【請求項5】 脳神経細胞にタウプロテインキナーゼIに対し阻害作用を有する物質を作用させることを特徴とする脳神経細胞死を阻止する方法。

【請求項6】 脳神経細胞にタウプロテインキナーゼIのDNAまたはmRNAとハイブリダイズ可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドを作用させることを特徴とする脳神経細胞死を阻止する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はアルツハイマー病の予防または治療薬およびそのスクリーニング方法に存し、詳しくはタウプロテインキナーゼI阻害剤を用いたアルツハイマー病の予防または治療薬およびアミロイド β プロテインを利用したアルツハイマー病の予防または治療薬のスクリーニング方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 アルツハイマー病は初老期(45~65才)に発病する進行性の痴呆で、病的な変化として神経細胞の変質及び神経細胞数の減少による大脳皮質の萎縮が認められ、また病理学的には、脳内に多数の老人斑と神経原線維変化が認められる。65才以上の老年期に発症する自然老化による老年痴呆も、病理学的に何等本質的差は認められないでアルツハイマー型老年痴呆と呼ばれている。この疾患の患者数は、高齢者人口の増加と共に増大し社会的に重要な疾患となっている。しかし、この疾患の原因については諸説あるものの結果的には未だ不明であり早期の解明が望まれている。

【0003】 アルツハイマー病及びアルツハイマー型老年痴呆に特徴的な二つの病理変化の出現量は、知能障害の程度とよく相関することが知られている。そこで、この二つの病理変化を生ずる不溶性の蓄積物質を分子レベル

で解明し、この疾患の病因に到達しようとする研究が1980年代の前半頃から行われてきた。

【0004】 この病理変化の一つである老人斑の主要成分がアミロイド β プロテイン(以下「A β P」と略することもある)であることが解明されている[Annu. Rev. Neurosci. 12, 463~490(1989)]。また、もう一つの病理変化である神経原線維変化は、神経細胞内にPHF(ペード・ヘリカル・フィラメント: paired helical filament)と呼ばれる二重らせん状の纖維状物質が蓄積していくものであり、近年、その構成成分として脳に特異的な微小管付随蛋白質の一種であるタウ蛋白質とユビキチンとが同定されている[J. Biochem., 99, 1807~1810(1986); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913~4917(1986)]。

【0005】 そして、アルツハイマー病は、脳神経細胞内にアミロイド β プロテインが異常に蓄積し、これがPHFの形成と連繋して神経細胞の死を招くものと考えられている。タウ蛋白質は、通常SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量48~65 kd)に数本のバンドを形成する一群の近縁蛋白質であり微小管の形成を推進する。

【0006】 アルツハイマー病脳のPHF中に組み込まれたタウ蛋白質は、通常のタウ蛋白質よりも異常にリン酸化されていることが、PHFに対するポリクローナル抗体[抗ptau: J. Biochem., 99, 1807~1810(1986)]や、タウ蛋白質に対するモノクローナル抗体[tau-1抗体: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913~4917(1986)]を用いて証明されている。

【0007】 この異常なリン酸化を触媒する酵素が単離され、タウプロテインキナーゼI(以下「TPK I」と略記することもある)と命名され、その理化学的性質が解明されている[生化学, 第64巻, 第5号, 308頁, (1992)]。

更に、TPK Iの部分アミノ酸配列に基づいてラット大脳皮質cDNAライブラリーからラットTPK IのcDNAがクローニングされ、その塩基配列が決定されたと共にアミノ酸配列が推定された(特願平4-177241号)。その結果、このラットTPK Iの一次構造がラットGSK-3 β (グリコーゲン・シンターゼ・キナーゼ3 β)として知られる酵素の一次構造と一致することが確認されている[EMBO J., 9, 2431~2438(1990)]。

【0008】 【発明が解決しようとする課題】 本発明は、アルツハイマー病の脳に特異的に見られる、アミロイド β プロテイン及びPHFの蓄積と神経細胞死との関連を解明し、アルツハイマー病の病因の解明、更には、これを予防又は治療する薬物の探索への応用を意図するものである。

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記の目標を達成するため検討中のところ、脳神経細胞にアミロイド β プロテインを作用させると、TPK Iの活性が著しく増大してアルツハイマー病脳のPHF中に認められる異常にリン酸化されたタウ蛋白質が表われ、また神経細胞が死滅すること、並びに上記TPK I活性の増大及

び脳神経細胞の死滅はTPK Iのアンチセンスオリゴヌクレオチドを作用させることによって抑制されることを確認した。

【0009】本発明は上記の知見に基づいて更に検討を重ねた結果達成されたものであり、その要旨は、タウプロテインキナーゼIに対し阻害作用を有する物質を有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療薬、タウプロテインキナーゼIのDNAまたはmRNAとハイブリダイズ可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療薬、および、アルツハイマー病の予防または治療薬として有効であると推定される薬剤、神経細胞およびアミロイド β プロテインをインキュベートし、該神経細胞の細胞死が阻止されれば該薬剤がアルツハイマー病の予防または治療薬として有効であると判定する、アルツハイマー病の予防または治療薬のスクリーニング方法に存する。

【0010】以下、本発明を詳細に説明する。本発明においてタウプロテインキナーゼI(以下「TPK I」と略記することもある)に対し阻害作用を有する物質としては、該物質を神経細胞およびアミロイド β プロテインとともにインキュベートした際に、該神経細胞の細胞死を阻止する作用を有する物質であれば良く、化学的に合成された物質、微生物の菌体から抽出された物質等が挙げられる。また、本発明においてはTPK IのDNAまたはmRNAとハイブリダイズ可能なアンチセンスオリゴヌクレオチド(以下「TPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチド」と略記することもある)をアルツハイマー病の予防または治療に使用する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、蛋白質合成を遺伝子レベルで抑制できるため、近年、病因となる蛋白質の合成阻害剤として医療分野で注目されている。その原理は、アンチセンスRNA又はアンチセンスDNAがセンス配列のmRNAと塩基対を形成することにより遺伝情報の流れを遮断し、最終産物である蛋白質の合成を阻害することにある[医学のあゆみ, Vol. 162, No. 13, 909-911 (1992)]。

【0011】本法に適用されるTPK IアンチセンスオリゴヌクレオチドとしてはTPK IのDNAまたはmRNAとハイブリダイズ可能であって、転写の阻害、pre-mRNAのスプライシングの阻害、mRNA核膜透過の阻害、翻訳の阻害等によりTPK Iの合成を阻害する配列を有するものであればよく、通常15~30個程度のものが用いられる。具体的には、例えば、前記のEMBO J., 9, 2431-2438(1990)に記載されているラットGSK-3 β の一次構造(TPK Iの一次構造と同一)におけるTPK Iの翻訳開始領域の最初の6アミノ酸残基: Met Ser Gly Arg Pro Argに対応するTPK Iセンスオリゴヌクレオチド鎖: 5'-ATGTCGGGCGACCGAGA-3' (配列表の配列番号2) と相補的なTPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖: 5'-TCTCGGTGCCCCGACAT-3' (配列

表の配列番号3) や特願平5-41160号(平成5年3月2日出願)に記載されているヒトTPK Iの一次構造におけるTPK Iの翻訳開始領域の最初の6アミノ酸残基: Met Ser Gly Arg Pro Argに対応するTPK Iセンスオリゴヌクレオチド鎖: 5'-ATGTCAGGGCGGCCAGA-3' (配列表の配列番号4) と相補的なTPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖: 5'-TCTGGGCCGCCCTGACAT-3' (配列表の配列番号5) 等が用いられる。

【0012】上記のTPK Iセンスオリゴヌクレオチド及びTPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチドは市販の自動DNA合成機を用いて容易に合成することができる。なお、本発明のTPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチドは前述したようにTPK IのDNAまたはmRNAとハイブリダイズ可能であれば上記の配列のみに特に制限はされず、ハイブリッド形成能を損なわない範囲において一部の配列を任意の塩基に置換しても差し支えない。また、Science, 259, 373-377(1993)に記載の、血液脳関門を通過するような改変または修飾を施したアンチセンスオリゴヌクレオチドも本発明の範囲に含まれる。

【0013】上記のTPK Iに対し阻害作用を有する物質またはTPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチドをアルツハイマー病の予防または治療薬として用いる場合、通常の担体とともに投与経路に応じた製剤とする事が出来る。例えば、経口投与では錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等の形態に調剤される。経口投与用固形製剤に調製するに当たり、慣用の賦形剤、結合剤、滑沢剤、その他着色剤、崩壊剤等を用いることができる。賦形剤としては、例えば、乳糖、デンプン、タルク、ステアリン酸マグネシウム、結晶セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、グリセリン、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム等が挙げられ、結合剤としてはポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、エチルセルロース、アラビアゴム、シエラック、白糖等が挙げられ、滑沢剤としてはステアリン酸マグネシウム、タルク等が挙げられる。その他、着色剤、崩壊剤も通常公知のものを用いることができる。なお錠剤は周知の方法によりコーティングしてもよい。また液状製剤は水性または油性の懸濁液、溶液、シロップ、エリキシル剤、その他であってよく、通常用いられる方法にて調製される。注射剤を調製する場合は本発明化合物にpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、等張剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下、筋肉内、静脈内用注射剤を製造することができる。坐剤を製造する際の基剤としては、例えばカカオ脂、ポリエチレンジリコール、ウイテプゾール(登録商標ダイナマイトイノーベル社)等の油脂性基剤を用いることができる。

【0014】かくして調製される製剤の投与量は患者の

症状、体重、年齢等によって異なり、一様に決定することは出来ないが、通常成人1日当たり本発明化合物を約1-1000mgの範囲となる量とするのがよく、これは通常1日1-4回に分けて投与されるのが好ましい。また場合により、投与は1回/1日~数日あるいはそれ以上の間隔で投与することも可能である。本発明で使用される神経細胞としては、哺乳動物から採取した脳神経細胞の他、脳神経細胞のセルラインに対し、NGF(神経成長・栄養因子)、IGF(インシュリン様成長因子)等の成長因子で誘導をかけて神経突起を伸展させたものが挙げられる。前者としては、哺乳動物、例えばラットの海馬の組織を摘出し、完全培地内で培養した培養液が用いられる。後者としては、NGF、FGF(繊維芽細胞因子)、EGF(上皮細胞成長因子)、インターロイキン6等で誘導をかけたPC12細胞(Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 31, 205-228(1991))、IGFで誘導をかけたSH-SY5Y細胞(The Journal of Cell Biology, 102, 1949-1954(1986))のほか、Cell Culture in the Neurosciences, New York:Plenum Press, p95-123(1985)に記載の、NGFで誘導をかけたMJB細胞、NMB細胞、NGP細胞、SK-N-SH-SY5Y細胞、LAN-1細胞、KA-9細胞、IMR-32細胞、5-ブロモデオキシリジンで誘導をかけたIMR-32細胞、NMB細胞、NGP細胞等が挙げられる。アミロイドβプロテインは、アルツハイマー病の老人斑の主要成分であって、下記43個のアミノ酸残基のペプチドから構成されることが知られている[Science250, 279-282(1990)及びProc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9020-9023(1990)]。

【0015】アミロイドβプロテインのアミノ酸配列(配列表の配列番号1): Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Glu Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr.

【0016】以下、本発明の一例として、ラット海馬細胞を用い、これに所定量のアミロイドβプロテイン(以下「AβP」と略記する)、比較対照物質としてのTPK Iセンスオリゴヌクレオチド(以下「TPK I-センス」と略記する)及びTPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチド(以下「TPK I-アンチセンス」と略記する)を所定の条件下で作用させた場合における海馬細胞の挙動並びにTPK Iのリン酸化活性について、更に詳細に説明する。本発明をアルツハイマー病の予防および治療薬のスクリーニング方法として実施する場合は、神経細胞としてラット海馬細胞を使用し、アルツハイマー病の予防または治療薬であると推定される薬剤としてTPK I-センスまたはTPK I-アンチセンスを使用する。

【0017】海馬細胞の培養液に、所定量のTPK I-アンチセンスを所定温度で加え、次いで所定量のAβPを添加して所定の温度に保持し、時間の経過に伴う生存細胞数を後記実施例に示す方法により測定した。比較のため、AβPのみを添加して同様に処理した場合、及びTPK I-センスとAβPとを添加して同様に処理した場合について生存細胞数を測定した。その結果、TPK I-アンチセンスとAβPを添加した場合の生存細胞数は、後記実施例に示すように、AβPのみを添加した場合及びTPK I-センスとAβPを添加した場合の生存細胞数に比較して著しく大きく、TPK I-アンチセンスがAβPによる細胞死を阻止する作用を有することを示した。

【0018】また、細胞培養液に、TPK I-アンチセンスとAβPを添加して24時間保持した場合、AβPのみを添加して同時間保持した場合、並びにTPK I-センスとAβPを添加して同時間保持した場合の試料の位相差顕微鏡(倍率:400倍)による観察結果では、TPK I-アンチセンスを作用させた場合のみがAβPによる細胞毒性が少なくコントロールに近似していることが判明した。

【0019】更に細胞培養液に、上記と同様にAβPのみを添加して保持した場合、及びTPK I-アンチセンスとAβPを添加して保持した場合について、24時間後のTPK Iによるタウ蛋白質のリン酸化活性を、後記実施例に示す方法により測定した。その結果、TPK I-アンチセンスとAβPを添加した場合におけるTPK Iのリン酸化活性は、後記実施例に示すように、AβPのみを添加した場合のリン酸化活性の約半分であり、TPK I-アンチセンスが、TPK Iのリン酸化活性を抑制する作用を有することを示した。以上の結果より、本発明をアルツハイマー病の予防および治療薬のスクリーニング方法として実施する場合は、TPK I-アンチセンスは該予防および治療薬として有効であると判定することができる。なお、TPK Iアンチセンスオリゴヌクレオチド以外の薬剤の有効性も同様にして判定できる。

【0020】

【実施例】以下に本発明を実施例について説明するが、本発明はその要旨を超えない限り以下の実施例に限られるものではない。なお、本実施例における細胞毒性の判定、タウ蛋白質のリン酸化の測定、並びにA1z-50抗体による免疫組織化学は以下の方法により実施した。また、以下の実施例は何れも別個に少なくとも3回の実験を行ない、データはそれらの平均値を示した。

【0021】細胞毒性の判定:多くの正常で健康な細胞の数は、位相差顕微鏡により、処理後の生存細胞の指標としてカウントした。正常な細胞は、形態学的に平滑な輪郭及び多数の神経細胞突起をもつ細胞を有するものとした。一方、変成した細胞は、不規則な形状、神経突起の変成等により判定した。なお、生存細胞数はウエル中

で数えた。標準培養液ではウエル当り400以上の細胞数であった。この結果を免疫組織化学的手法により確認した。

【0022】タウ蛋白質のリン酸化測定：海馬細胞は氷冷したリン酸塩緩衝液で3回洗浄して培地から採取した。細胞を、ホスファターゼ阻害剤(1 mM オカダ酸、生化工業社製)、プロテアーゼ阻害剤(1 mM のフェニルメチルスルホニルフロライド及び各1 μg/ml のロイペプチド、ペプスタチン、アプロチニン)を含有する20 mMのD-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸、0.5 mMの酢酸マグネシウム及び1 mMのEGTAを含有するpH 6.8の緩衝液A中に懸濁してホモジナイズし14000 gで1時間遠心し、上清をリン酸化の検定に用いた。

【0023】遺伝子組換によりE.coli BL21中で発現させたラットタウ蛋白質をJ.Biol.Chem. 267, 10897-10901 (1992)に記載の方法により精製した。1 μlの海馬細胞抽出物を、1 mMの[γ-³²P]ATP(10-20 Ci/mmol)を含む緩衝液Aに溶解したラットタウ蛋白質(400 μg/ml)の溶液に添加し、これに10 μMのオカダ酸を加えて最終的に10 μlとした。37°Cで3時間インキュベートした後、電気泳動用緩衝液を加えて反応を停止した。10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、タウ蛋白質中の³²Pをレーベイメージ分析機(Fuji BAS 2000)で観察した。

【0024】A1z-50抗体による免疫組織化学：海馬細胞の培養液をリン酸塩緩衝液中で4%パラホルムアルデヒドにより10分間固定した。固定した培養液を0.2%トリトンX-100を含むトリス緩衝塩液中で30分間インキュベートして細胞を浸透し易くした。次いで、この培養液を1:5に希釈したA1z-50マウスモノクロナールー一次抗体、ベクタステイン(Vectastain)ABCアビシン-ビオチン-過酸化酵素検出キット(ベクターラボラトリ-社製)を行い、色素としてジアミノベンジンテトラハイドロクロライドを用いて免疫標識した。

【0025】実施例1

細胞培養液の調製：ラットの海馬胚の初期培養液をBrain Res. 126, 397-425(1977)に記載の方法に準じて調製した。即ち、受精後18日のラット胚から海馬組織を採取し、ババイン(プロテアーゼ)10 U/ml中において37°Cで20分間消化した。得られた細胞を、ダルベッコ修飾イ-

グル媒地に、5%牛胎児血清、5%馬血清、インシュリン10 μg/ml、トランスフェリン0.1 mg/ml、アプロティニン1 μg/ml、ピルビン酸ナトリウム1 mM及びゲンタマイシン84 μg/mlを補足した媒地中に加えた。これをボリ-L-リジンで被覆した組織培養ウエルに、2×10⁵セル/cm²の密度で播いて3日間培養し、次いで1 μMのシトシン-β-アラビノフランサイドで24時間処理して培養5日の細胞を使用した。

【0026】AβPの調製：Science 250, 279-282(1990)及びProc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9020-9023(1990)に記載の方法により、前記43個のアミノ酸残基からなるAβPペプチドを合成し、精製した後、35%アセトニトリルに溶解して2 mMの貯蔵溶液を調製した。

【0027】TPK I-センス及びTPK I-アンチセンスの調製：ラットGSK-3 β [EMBO J., 9, 2431-2438 (1990)]の一次構造の翻訳開始領域に対応する下記18塩基のTPK I-センス及びこれと相補的なTPK I-アンチセンスを自動DNA合成機(MilliGen)を用いて合成し、20%アクリルアミド-尿素ゲルから回収してエタノール沈殿法により精製し、沈殿物を水に溶解して1 μMの濃度に調整した。

TPK I-センス : 5'-ATGTCGGGGC
GACCGAGA-3'

TPK I-アンチセンス : 5'-TCTCGGT CGC
CCCGACAT-3'

【0028】脳神経細胞死の阻止作用：前記方法で調製した海馬細胞の培養液を用いて以下に示す(b)～(d)の処理を行ない、時間の経過に伴う生存細胞数を数え、その結果を表1に示した。

30 (a)無処理培養液(コントロール)。

(b)細胞培養液1 mlに1 μMのTPK I-アンチセンスを加え5分後、20 μMのAβPを添加して37°Cで24時間保持した。

(c)細胞培養液1 mlに20 μMのAβPを加えて37°Cで24時間保持した。

(d)細胞培養液1 mlに1 μMのTPK I-センスを加え5分後、20 μMのAβPを添加し37°Cで24時間保持した。

【0029】

【表1】

処理剤	生存細胞数(%)	
	6時間後	24時間後
コントロール	100	100
AβP+TPK I-アンチセンス	83.0	72.6
AβP	41.3	25.4
AβP+TPK I-センス	49.5	17.1

【0030】表1は、上記の(b)、(c)及び(d)の処理の時間経過に伴う生存細胞数を示し、生存細胞数はコントロールに対する百分率(%)で表わした。表1に示されるように、海馬細胞にTPK I-アンチセンス及びA β Pを作用させた場合(b)の6時間及び21時間経過後の生存細胞数は、A β Pのみを作用させた場合(c)及びTPK I-センスとA β Pとを作用させた場合(d)の生存細胞数を遥かに凌駕した。この事実は、TPK I-アンチセンスが、A β Pによる細胞死を著しく阻止する作用を有することを明瞭に示している。また、上記(b)～(d)の37℃、24時間経過後の位相差顕微鏡(倍率:400倍)観察では、海馬細胞にTPK I-アンチセンス及びA β Pを作用させた場合(b)のみがA β Pによる細胞毒性が少なくコントロールに近似することが判明した。

【0031】タウ蛋白質のリン酸化：

■無処理細胞培養液(コントロール)、■細胞培養液1 mlに1 μ MのTPK I-アンチセンスを加え5分後に20 μ MのA β Pを添加した試料、及び■細胞培養液1 mlに20 μ MのA β Pを加えた試料について、前記の方法によりTPK Iのリン酸化活性を測定し、その結果を表2に示した。なお、表2におけるTPK Iのリン酸化活性は、上清中の蛋白質1 mg当たりのリン酸化活性(単位/mg蛋白質)を表わし、一単位はレーザーイメージ分析機(BAS 200, Fuji)により測定した放射能の強度と等価である。

【0032】

【表2】

処理剤	TPK Iのリン酸化活性 (単位/mg蛋白質)
コントロール	39.6
A β P+TPK I-アンチセンス	31.6
A β P	66.2

30

【0033】表2に示すように、細胞培養液にTPK I-アンチセンス及びA β Pを作用させた場合■のTPK Iのリン酸化活性は、A β Pのみを作用させた場合■のリン酸化活性の約半分であり、TPK I-アンチセンスが、A β PによるTPK Iのリン酸化活性を大幅に抑制することが明らかである。

【0034】

【発明の効果】本発明のアルツハイマー病の予防および治療薬によればアミロイド β プロテインによるタウプロテインキナーゼIのリン酸化活性を抑制することにより、脳神経細胞死を阻止することができる。さらにその機構を利用してアルツハイマー病の予防又は治療薬のスクリーニングを行うことが可能である。

【0035】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：43

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

20 配列の種類：ペプチド

配列

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln
1						5				10			15	

Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala
								20		25		30		

Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala	Thr		
								35		40				

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

アンチセンス：Y_es

トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：合成DNA

配列

TCTCGGTGCG CCGGACAT 18

【0038】配列番号：4

【0036】配列番号：2

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATGTCGGGGC GACCGAGA 18

【0037】配列番号：3

11

配列の長さ：18
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：合成DNA
 配列
 ATGTCAGGGC GGCCAGA 18
 【0039】配列番号：5

12

配列の長さ：18
 配列の型：核酸
 鎖の数：一本鎖
 アンチセンス：Y_es
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：合成DNA
 配列
 TCTGGGCCGC CCTGACAT 18

【手続補正書】

【提出日】平成6年6月21日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】A1z-50抗体による免疫組織化学：海馬細胞の培養液をリン酸塩緩衝液中で4%パラホルムアルデヒドにより10分間固定した。固定した培養液を0.2

%トリトンX-100を含むトリス緩衝塩液中で30分間インキュベートして細胞を浸透し易くした。次いで、この培養液を1:5に希釈したA1z-50マウスモノクローナル一次抗体(Science, 232, 648-650(1986))、ベクタスティン(Vectastain)ABCアビジン-ビオチン-過酸化酵素検出キット(ベクターラボラトリーソ製)を用い、色素としてジアミノベンジジンテトラハイドロクロライドを用いて免疫標識した。

フロントページの続き

(72)発明者 斎藤 健一
 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三
 菱化成株式会社総合研究所内